

氏 名	おぐら けいすけ 小倉 圭介
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	富医薬博甲第 263 号
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 23 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教 育 部 名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程 薬科学専攻
学 位 論 文 題 目	がん悪性化進展制御におけるナチュラルキラー細胞の役割
論文審査委員	
（主査）	教 授 櫻井 宏明
（副査）	教 授 宗 孝紀
（副査）	教 授 早川 芳弘 （指導教員）

論文内容の要旨

はじめに

腫瘍内で形成される微小環境は、がん細胞のみならず免疫細胞、血管細胞、上皮細胞、繊維芽細胞などの成分の他に、液性成分や細胞外マトリックス等の間質を含む多様な細胞集団によって構成されており、これらの細胞集団の一部はがん細胞を異物として認識し排除する抗腫瘍免疫応答を示す。代表的な抗腫瘍エフェクター細胞として自然免疫系に属するナチュラルキラー(NK)細胞が知られている。NK細胞は前感作を必要とせずにごん細胞を傷害する性質から発見された自然リンパ球である。NK細胞はストレス誘導性リガンドやウィルス誘導性リガンドなどの非自己を活性化受容体で認識する事により、パーフォリンやグランザイム等の細胞傷害性顆粒、あるいは Fas リガンドや TRAIL などのデスリガンドを介して標的細胞に対してエフェクター機能を発揮する。また、NK細胞はインターフェロンを代表とした種々の抗腫瘍サイトカインを産生することで、がん細胞の増殖抑制、MHC 分子の発現抑制、血管新生抑制といった機能も発揮する。

一方、慢性炎症に代表されるがん悪性化を促進するような向腫瘍免疫応答の重要性が指摘されている。このようながん悪性化に関わる代表的な免疫担当細胞として好中球やマクロファージに代表される炎症性細胞が知られている。これらの炎症性細胞はサイトカインやケモカイン、様々な成長因子を含む炎症性メディエーターの産生を介してがん細胞の増殖のみならず、転移浸潤能の獲得や抑制性免疫応答の誘導に寄与する事が知られている。

以上、がん悪性化進展の制御において腫瘍微小環境における相反する免疫応答（抗腫瘍免疫応答と向腫瘍免疫応答）のバランスの制御が非常に重要である事が強く示唆されるが、そのメカニズムは未だ十分に解明されていない。近年のがん免疫療法の臨床での成功をさらに発展させ、より効果的ながん治療戦略を考える上で、がん悪性化進展に関わる腫瘍微小環境での免疫バランスの制御機構の解明が非常に重要である。本研究では、抗腫瘍エフェクター細胞として広く認識されている NK 細胞の新たな機能として、向腫瘍免疫応答としての炎症制御によるがん悪性化進展の抑制機構を明らかにした。

第一章 NK 細胞によるがん関連炎症と血管新生の制御

NK 細胞はサイトカイン産生や細胞傷害活性を介したエフェクター機能、さらには抗原提示細胞とのクロストークを介して抗腫瘍免疫応答において重要な役割を担うことが知られて

いるが、一方で NK 細胞が腫瘍微小環境においてがん細胞の悪性化に寄与する炎症制御に関わるか否かについて明らかでない。そこで、第一章ではがん関連炎症制御における NK 細胞の役割について検討を行った。C57BL/6(B6)マウス由来 MCA 誘発 fibrosarcoma 細胞株 MCA205 のルシフェラーゼ恒常的発現細胞株 MCA205-Luc2 細胞を皮下移植し、インビボイメージングシステムを用いて発光活性の変化を経時的に測定しがん細胞増殖をモニタリングした。移植後の微小腫瘍内でのがん細胞に対する宿主免疫応答の役割を解析するため、抗体投与による各免疫担当細胞を depletion したマウス、IFN- γ または IL-17 欠損マウスにおけるがん細胞増殖を野生型 B6 マウスと比較して免疫担当細胞やサイトカインの役割を検討した。NK 細胞除去マウスならびに IFN- γ 欠損マウスの結果から、腫瘍移植後早期では主に NK 細胞が IFN- γ を介したメカニズムでがん細胞増殖を抑制している事が確認出来た。また興味深い事に、がん促進に働く炎症性免疫応答に重要である事が知られている IL-17 の欠損マウスでは、NK 細胞除去によるがん細胞増殖の促進が認められなかった。IL-17 は好中球性炎症の誘導に重要なサイトカインである事が知られているが、NK 細胞除去マウスにおいて観察されるがん細胞増殖の促進も好中球の Ly6G 抗体による depletion により認められなくなった。フローサイトメトリーによる腫瘍浸潤細胞の解析結果から、NK 細胞除去マウスにおける好中球の浸潤割合に変化は認められなかったが、一方で NK 細胞除去マウスの腫瘍内好中球での VEGF-A 発現上昇、さらには NK 細胞除去マウスで好中球依存的に血管新生亢進が認められた。実際に NK 細胞除去マウスでは VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (SU5416) がコントロール群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した事から、好中球依存性に誘導される血管新生が腫瘍増殖に重要である事を示した。加えて、代謝拮抗薬としてがん治療に用いられる 5-FU は全身性の好中球減少を引き起こす事が知られているが、NK 細胞除去マウスでは直接の抗腫瘍効果を示さない低用量の 5-FU 投与が好中球依存的にがん細胞増殖を抑制する事を明らかとした。これらの結果は、好中球の血管新生促進的な変化を制御する事でがん細胞増殖を抑制するという NK 細胞の新たな機能を示している。以上の結果は、がん細胞を直接傷害するエフェクター細胞としての役割とは異なる新たな NK 細胞の機能として、腫瘍促進的に働く好中球性炎症の抑制によるがん細胞の増殖制御に関わる可能性を示唆すると考えられる。

第二章 NK 細胞によるがん抑制性免疫応答とがん転移形質獲得の制御

腫瘍微小環境における慢性炎症をはじめとする向腫瘍免疫応答はがん細胞の増殖のみならず、転移浸潤能の獲得や抑制性免疫応答の誘導に寄与する事が知られている。NK 細胞は直接のエフェクター機能に加えて、がん関連炎症の制御細胞として機能している事を前章で示した。そこで第二章では NK 細胞のがん悪性化進展制御における役割をさらに理解するため、腫瘍内炎症性微小環境の解析を行った。C57BL/6(B6)マウス由来 melanoma 細胞株 B16F10 のルシフェラーゼ恒常的発現細胞株 B16F10-Luc2 細胞を皮下移植し、腫瘍サンプルから産生され

る炎症性サイトカイン・ケモカインをマルチプレックスアッセイによって網羅的に解析した。抗体投与により NK 細胞を depletion したマウス、または IL-17 欠損マウスからそれぞれ回収した腫瘍サンプルと比較検討した。その結果、除去マウスでは IL-6, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, RANTES といった炎症メディエーターの産生が顕著に亢進しており、特に IL-6 の産生亢進が顕著であった。この NK 細胞除去マウスにおける腫瘍内 IL-6 の産生亢進には IL-17 が必須である事が IL-17 欠損マウスの結果から示された。炎症性サイトカインである IL-6 は IL-6 受容体を介して JAK-STAT 系、特に STAT3 の活性化を介してがん悪性化進展に寄与する事が広く知られている。IL-6 による STAT3 の活性化は腫瘍内に浸潤する免疫抑制細胞の誘導、特に骨髄由来制御細胞(Myeloid-derived suppressor cells : MDSCs)の誘導に重要である事が報告されている。実際にフローサイトメトリーによる解析の結果、NK 細胞除去マウスでは B16F10 メラノーマ腫瘍内に浸潤する好中球性骨髄由来制御細胞(G-MDSCs)の占める割合の顕著な増加が認められた。つまり NK 細胞除去マウスの腫瘍微小環境では IL-6 の産生亢進、MDSC の浸潤増加に見られる慢性炎症が亢進していた。重要な事に、NK 細胞除去マウスの腫瘍微小環境下に B16F10-Luc2 細胞を繰り返し暴露し新たに樹立した細胞株 (N2 細胞株) は、コントロール株 (C2 細胞株) と比較して顕著な MMP-2 の産生亢進と肺転移能の亢進を認めた。以上の結果は、NK 細胞が IL-6-STAT3 経路を介したがん炎症性微小環境の制御によって、がん抑制性免疫応答とがん転移形質獲得に関わる事を示す新たな知見である。

参考文献

- (1) Ogura K., Sato-Matsushita M., Yamamoto S., Hori T., Sasahara M., Iwakura Y., Tahara H., Saiki I. and Hayakawa Y.: NK cells control tumor-promoting function of neutrophils in mice. Cancer Immunol Res, 2017, in press.
- (2) Abdelhamed S., Ogura K., Yokoyama S., Saiki I. and Hayakawa Y.: AKT-STAT3 pathway as a downstream target of EGFR signaling to regulate PD-L1 expression on NSCLC cells. J Cancer, 18;7(12):1579-1586 2016.

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

腫瘍内で形成される微小環境は、がん細胞のみならず免疫細胞、血管細胞、上皮細胞、繊維芽細胞などの成分の他に、液性成分や細胞外マトリックス等の間質を含む多様な細胞集団によって構成されており、これらの腫瘍微小環境を構成する細胞として宿主免疫細胞がある。免疫細胞の中にはがん細胞を異物として認識し排除する抗腫瘍免疫応答に関わる細胞が存在し、このような抗腫瘍エフェクター細胞としてナチュラルキラー(NK)細胞の重要性が広く知られている。NK細胞はストレス誘導性リガンドやウィルス誘導性リガンドなどの非自己を活性化受容体で認識する事により、標的細胞に対して細胞傷害活性やインターフェロンの産生によってエフェクター機能を示す。このような抗腫瘍免疫応答に加え、近年慢性炎症に代表されるがん悪性化を促進するような免疫応答が存在し、その二面性が指摘されている。このようながん悪性化に関わる免疫細胞として、好中球やマクロファージに代表される炎症性細胞などが知られている。これらの炎症性細胞はサイトカインやケモカイン、様々な成長因子を含む炎症性メディエーターの産生を介してがん細胞の増殖のみならず、転移浸潤能の獲得や抑制性免疫応答の誘導に寄与する事が知られている。がんに対する免疫応答の二面性は、がん悪性化進展の制御において相反する免疫応答のバランスの制御が非常に重要である事を強く示唆するが、その制御メカニズムは未だ十分に解明されていない。本研究では、抗腫瘍エフェクター細胞として広く認識されているNK細胞の新たな機能として、炎症性免疫応答の制御によってがん悪性化進展の抑制にかかわる新しい機能を明らかにした。

第一章ではがん関連炎症制御におけるNK細胞の役割について検討を行った。マウス線維肉腫株MCA205のルシフェラーゼ恒常的発現細胞株MCA205Luc2細胞を皮下移植する実験系で、がん増殖の定量化にはインビボイメージングシステムを用いた生物発光イメージングを用いて行った。移植後の微小腫瘍内でのがん細胞に対する宿主免疫応答の役割を解析するため、抗体投与による各免疫担当細胞をdepletionしたマウス、IFN- γ またはIL-17欠損マウスにおけるがん細胞増殖を野生型B6マウスと比較して免疫担当細胞やサイトカインの役割を検討した。NK細胞除去マウスならびにIFN- γ 欠損マウスの結果から、腫瘍移植後早期では主にNK細胞がIFN- γ を介したメカニズムでがん細胞増殖を抑制している事が確認出来た。また興味深い事に、がん促進に働く炎症性免疫応答に重要である事が知られているIL-17の欠損マウスでは、NK細胞除去によるがん細胞増殖の促進が認められなかった。IL-17は好中球性炎症の誘導に重要なサイトカインである事が知られているが、NK細胞除去マウスにおいて観察されるがん細胞増殖の促進も好中球のLy6G抗体によるdepletionにより認められなくなった。フローサイトメトリーによる腫瘍浸潤細胞の解析結果から、NK細胞除去マウスにおける好中球の浸潤割合に変化は認められなかったが、一方でNK細胞除去マウスの腫瘍内好中球でのVEGF-A発現上昇、さらにはNK細胞除去マウスで好中球依存的に血管新生亢進が認められた。実際にNK細胞除去マウスではVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤(SU5416)がコントロール群と比較して有意に腫瘍増殖を抑制した事から、好中球依存性に誘導さ

れる血管新生が腫瘍増殖に重要である事を示した。加えて、代謝拮抗薬としてがん治療に用いられる5-FUは全身性の好中球減少を引き起こす事が知られているが、NK細胞除去マウスでは直接の抗腫瘍効果を示さない低用量の5-FU投与が好中球依存的にがん細胞増殖を抑制する事を明らかとした。これらの結果は、好中球の血管新生促進的な変化を制御する事ががん細胞増殖を抑制するというNK細胞の新たな機能を示している。

第二章ではNK細胞のがん悪性化進展制御における役割をさらに探索するため、腫瘍内炎症性微小環境の網羅的解析を行った。マウスメラノーマ細胞株B16F10のルシフェラーゼ恒常的発現細胞株B16F10Luc2細胞を皮下移植し、腫瘍サンプルから産生される炎症性サイトカイン・ケモカインをマルチプレックスアッセイによって網羅的に解析した。抗体投与によりNK細胞をdepletionしたマウス、またはIL-17欠損マウスからそれぞれ回収した腫瘍サンプルを比較検討した結果、NK細胞除去マウスではIL-6, IL-23, IP-10, KC, MCP-1, RANTESといった炎症メディエーターの産生が顕著に亢進しており、特にIL-6の産生亢進が顕著であった。このNK細胞除去マウスにおける腫瘍内IL-6の産生亢進にはIL-17が必須である事がIL-17欠損マウスの結果から示された。炎症性サイトカインであるIL-6はIL-6受容体を介してJAK-STAT系、特にSTAT3の活性化を介してがん悪性化進展に寄与する事が広く知られている。IL-6によるSTAT3の活性化は腫瘍内に浸潤する免疫抑制細胞の誘導、特に骨髄由来制御細胞(Myeloid-derived suppressor cells : MDSCs)の誘導に重要である事が報告されているが、実際にフローサイトメトリーによる解析の結果からNK細胞除去マウスではB16F10メラノーマ腫瘍内に浸潤する好中球性骨髄由来制御細胞(G-MDSCs)の占める割合の顕著な増加が認められた。つまりNK細胞除去マウスの腫瘍微小環境ではIL-6の産生亢進、MDSCの浸潤増加に見られる慢性炎症が亢進していた。このような炎症性サイトカインが多く産生されるNK細胞除去マウスの腫瘍微小環境下に繰り返し暴露したB16F10Luc2細胞は、コントロール実験群と比較してMMP-2の産生亢進や肺転移能の亢進といった悪性化形質の獲得を認めた。以上の結果は、NK細胞がIL-6-STAT3経路を介したがん炎症性微小環境の制御によって、がん抑制性免疫応答とがん転移形質獲得に関わる事を示す新たな知見である。多くのがん患者においてNK細胞の機能低下や不全が見られることから、今回の研究成果はNK細胞のがん悪性化進展制御に関わる機能に着目した新しいがん治療へとつながる可能性を示した。

主査及び副査は、申請者小倉圭介氏の本学位論文の内容を精査するとともに面接審査を行い、小倉圭介氏が博士(薬科学)の学位を受けるに十分に値すると判断した。

1. Ogura K, Sato-Matsushita M, Yamamoto S, Hori T, Sasahara M, Iwakura Y, Saiki I, Tahara H, Hayakawa Y. NK cells control tumor-promoting function of neutrophils in mice. *Cancer Immunol Res.* 2018 Jan 23. pii: canimm.0204.2017.
2. Abdelhamed S, Ogura K, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. AKT-STAT3 pathway as a downstream target of EGFR signaling to regulate PD-L1 expression on NSCLC cells. *J Cancer.* 2016; 7(12):1579-1586.